

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/005901 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 21/76, 21/66, 33/543

(FR). UNIVERSITE JOSEPH FOURIER [FR/FR];
621, avenue Centrale, Domaine Universitaire, F-38041
GRENOBLE CEDEX 9 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002058

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BIDAN,
Gérard [FR/FR]; 3 rue des Trois Epis, F-38100 GRENOBLE
(FR). BILLON, Martial [FR/FR]; 7B, chemin Barral, F-38100 Grenoble (FR).

(22) Date de dépôt international : 2 juillet 2003 (02.07.2003)

(74) Mandataire : AUDIER, Philippe; c/o Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

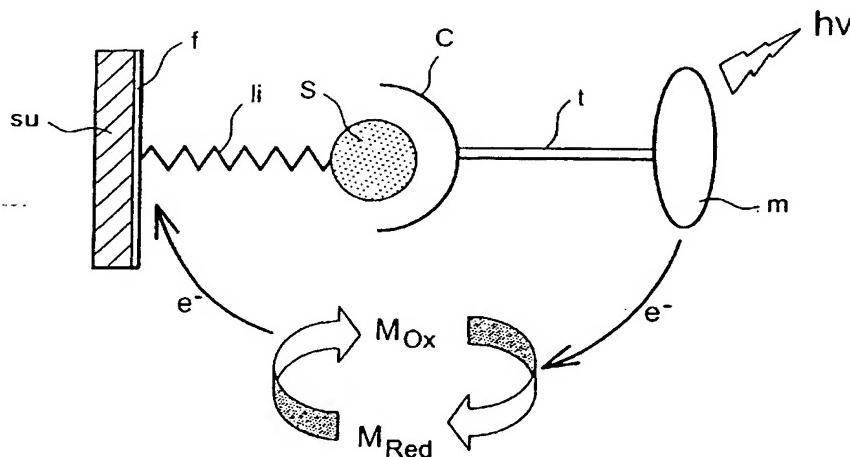
(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DETECTION OF MOLECULAR IDENTIFICATION BY ELECTROCHEMILUMINESCENCE ON CONDUCTIVE POLYMER

(54) Titre : DETECTION D'UNE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE PAR ELECTROCHIMILUMINESCENCE SUR POLYMERE CONDUCTEUR



WO 2004/005901 A1

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting molecular identification by electrochemiluminescence mediated on electronic conductive polymer. Said method comprises steps which consist in: a) providing a test support including one surface comprising a conductive polymer film, said film containing a probe molecule; b) marking prior to or after step c) the target molecule with an electrochemiluminescent marker; c) contacting the target molecule with the test support in physical and chemical conditions enabling molecular identification and specific linkage between the probe molecule and the target molecule; d) rinsing the test support so as to eliminate excess electrochemiluminescent marker while preserving the specific linkage between the probe molecule and the target molecule of step c); and e) subjecting the rinsed test support obtained at step d) to a reading of the signal of electrochemiluminescence enabled by electronic transfer between the target marker and the support via a redox relay.

[Suite sur la page suivante]



SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

- (57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé de détection d'une reconnaissance moléculaire par électrochimiluminescence médiaitée sur polymère conducteur électronique. Ce procédé comprend les étapes consistant : a) à mettre en présence un support test comprenant une surface comportant un film polymère conducteur, ledit film comportant une molécule sonde ; b) à marquer avant ou après l'étape c) la molécule cible avec un marqueur électrochimiluminescent ; c) à mettre en contact la molécule cible avec le support test dans des conditions physiques et chimiques permettant la reconnaissance moléculaire et l'assemblage spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible ; d) à rincer le support test de manière à supprimer l'excès de marqueur électrochimiluminescent tout en préservant l'assemblage spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible de l'étape c) ; et e) à soumettre le support test rincé obtenu à l'étape d) à une lecture du signal d'électrochimiluminescence rendue possible par un transfert électronique entre le marqueur de la cible et le support via un relais rédox.

**DETECTION D'UNE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE PAR
ELECTROCHIMILUMINESCENCE SUR POLYMERÉ CONDUCTEUR**

DESCRIPTION

5 Domaine technique

La présente invention se rapporte à un procédé de détection d'une reconnaissance moléculaire par électrochimiluminescence sur un polymère conducteur à conduction électronique. Elle permet de manière générale la détection quantitative et qualitative d'une reconnaissance moléculaire entre une première molécule fixée sur un support et une deuxième molécule recherchée dans un échantillon.

Elle concerne le domaine au sens large des capteurs et biopuces, en particulier ceux ou celles comprenant au moins un film polymère conducteur électronique tel que le polypyrrole et leurs dérivés. Cette invention est relative à la détection par chimiluminescence électrogénérée ou électrochimiluminescence (ECL) via un relais présentant des propriétés d'oxydo-réduction, appelé dans la présente « relais rédox ».

Selon l'invention, la reconnaissance moléculaire peut être définie comme une interaction spécifique entre deux molécules plus ou moins complexes, conduisant à une liaison ou assemblage des deux molécules suffisamment stable pour que les molécules puissent être détectées lorsqu'elles sont liées. Il peut s'agir par exemple d'une hybridation d'acides nucléiques (ADN et/ou ARN), d'une réaction de reconnaissance de type antigène/anticorps, d'une

interaction de type protéine/protéine, d'une interaction sucre/protéine, d'une interaction de type enzyme/substrat, d'une interaction de type ADN double brin/protéine, etc.

5 Le procédé de la présente invention trouve par exemple une application dans la détection dans le domaine des "Biopuces" au sens large c'est-à-dire des puces à acides nucléiques et des puces à protéines ou tous systèmes y compris multiparamétriques pour l'étude
10 de la reconnaissance sonde-cible de substrats biologiques. Il s'agit par exemple de la détection d'hybridation d'acides nucléiques sur support solide, en milieu aqueux ou à l'air, par exemple dans le cadre d'un criblage ("screening") ou d'une détection
15 d'hybridation sur une biopuce.

Le procédé de la présente invention peut être appliqué à toutes finalités de marquage sur des surfaces de polymères conducteurs à conduction électronique par un système électrochimiluminescent.

20 Dans la présente description, les références entre crochets [] renvoient à la liste de référence annexée.

Etat de la technique

Les biocapteurs miniaturisés ou biopuces sont actuellement l'objet d'enjeux économiques majeurs. Cet attrait s'explique par leur capacité de pouvoir réaliser des milliers d'analyses en parallèle ainsi que par leur vaste champ d'application touchant à la fois le domaine du diagnostic médical, du contrôle
25 environnemental et agro-alimentaire, ainsi que celui de la pharmacologie.
30

Ces systèmes sont constitués de molécules sondes, généralement de molécules biologiques telles que des fragments d'ADN, ou plus généralement des fragments d'oligonucléotides (ou ODN), immobilisées sur de très petites surfaces. Ces sondes, de par leur capacité de reconnaître spécifiquement des entités biologiques données, appelées molécules cibles, comme des brins d'ADN ou d'ODN complémentaires, confèrent au biocapteur une sélectivité de reconnaissance.

La sensibilité de ces biocapteurs dépend en partie de la technique mise en oeuvre pour révéler le phénomène de reconnaissance molécules sondes/molécules cibles.

De nombreux outils ont été développés pour détecter ces reconnaissances moléculaires. Certaines techniques utilisent des marqueurs fluorescents qui offrent une grande sensibilité de détection. Cependant, ces techniques nécessitent une excitation laser des fluorophores greffés sur les biomolécules cibles qui peut s'accompagner également par une fluorescence résiduelle parasite provenant de l'illumination du support et des biomolécules.

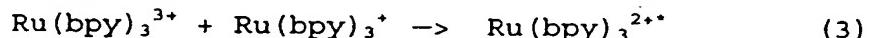
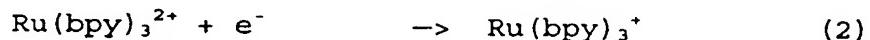
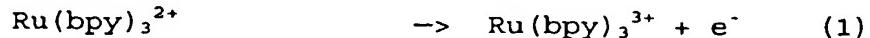
D'autres techniques utilisent des marqueurs électrochimiluminescents tels que le luminol et ses dérivés ou les composés organométalliques tel que le complexe $\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridine})_3^{2+}$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [1] et [2]. Malheureusement dans le cas du luminol et de ses dérivés, l'électrochimiluminescence (ECL) conduit à une destruction irréversible de la molécule de luminol ou de ses dérivés. L'émission de lumière correspond alors

à un flash, son intensité diminuant rapidement dans le temps.

Pour les marqueurs type $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, l'émission de luminescence ne s'accompagne pas de la destruction du 5 luminophore, le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ étant régénéré, mais sont utilisation ne peut malheureusement pas se faire sur tout type de support.

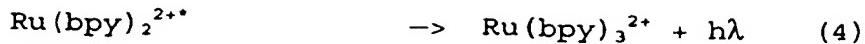
L'électrochimiluminescence du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est induite par la désactivation du complexe à l'état 10 excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$.

Ce complexe peut-être formé suivant une première voie par la réaction d'annihilation, réaction (3) ci-dessous, entre le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ et le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$; chacune de ces deux espèces étant électrogénérée à partir du 15 complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, respectivement par oxydation, décrite par la réaction (1) ci-dessous, et réduction, décrite par la réaction (2) ci-dessous, de ce dernier en appliquant alternativement, à une fréquence de l'ordre de 0,2 Hz, un potentiel de +1,3 V et -1,3 V (vs 20 Ag/AgCl).



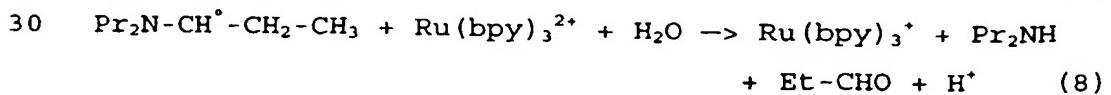
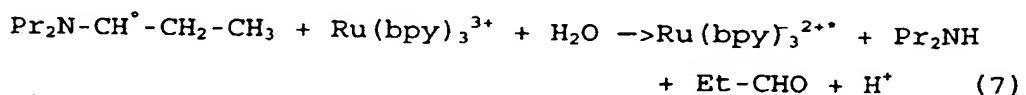
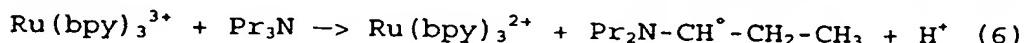
25

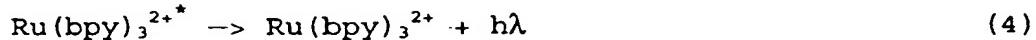
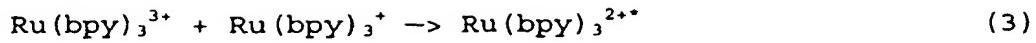
Cette réaction d'annihilation (3) conduit à la formation du complexe à l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ qui lors de sa désactivation, réaction (4), émet sous forme de flash une lumière centrée à 610 nm en redonnant le 30 complexe initial $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.



Cette première voie ne concerne pas le procédé de la présente invention.

Il est également possible, suivant une deuxième voie, à partir du complexe Ru(bpy)_3^{2+} d'observer une émission permanente à 610 nm par électrochimiluminescence en appliquant un potentiel constant de +1,3 V (vs Ag/AgCl). Dans ce cas, la présence d'un co-sousstrat, appelé aussi sousstrat sacrificiel, est alors requise. Ce composé qui peut-être une amine aliphatique type tripropylamine (Pr_3N), comme le décrit le document [1], génère un agent réducteur $\text{Pr}_2\text{N}-\text{CH}^\circ-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, comme le décrit la réaction (6) ci-dessous, qui peut soit réagir avec le complexe Ru(bpy)_3^{3+} pour former l'état excité Ru(bpy)_3^{2+*} , selon la réaction (7) ci-dessous, ou réduire l'espèce Ru(bpy)_3^{2+} en Ru(bpy)_3^+ , selon la réaction (8) ci-dessous, pour conduire au Ru(bpy)_3^{2+*} selon la réaction (3) ci-dessus. Comme précédemment, le complexe Ru(bpy)_3^{2+} n'est pas épuisé mais régénéré lors de l'électrochimiluminescence par contre le co-sousstrat est irréversiblement consommé.





C'est pourquoi par rapport au luminol ou ses dérivés les composés Ru(bpy)_3^{2+} sont des candidats plus attractifs en tant que marqueurs pour une détection par électrochimiluminescence.

Malheureusement, les potentiels de lecture du signal émis pour les marqueurs électrochimiluminescents tels que les complexes de ruthénium sont trop élevés pour pouvoir être utilisés sur des films de polymères conducteurs tels que ceux utilisés pour la fabrication de la plupart des capteurs et biopuces, par exemple tels que le polypyrrole dans les systèmes MICAM (marque déposée). En effet, ces potentiels conduisent à une suroxydation du film de polymère conducteur qui perd alors ses propriétés de conductivité électronique rendant le transfert électronique support/sonde insuffisant pour permettre une détection par ECL.

Foster et coll. [3] ont élaboré un capteur à base de Ru(bpy)_3^{2+} pour la détection d'ions oxalate. Dans ce cas, le complexe Ru(bpy)_3^{2+} est immobilisé par un lien covalent dans une matrice poly(4-vinylpyridine). Le principe de la détection des oxalates repose sur la génération électrochimique de Ru(bpy)_3^{3+} qui réagit ensuite avec l'analyte $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ pour conduire au complexe à l'état excité Ru(bpy)_3^{2+*} . Ce dernier émet ensuite à 610 nm lors de sa désactivation suivant la réaction (4) ci-dessus.

R. Blanchard et coll. [4] ont également développé un capteur pour la détection d'ions oxalates en

piégeant électrostatiquement un dérivé du complexe Ru(bpy)₃²⁺ dans une matrice polymère conducteur électronique. Le complexe de ruthénium sous sa forme sulfonique RuBPS (acide tris(4,7-diphenyl-1,10-phénantrolinedisulfonique) ruthénium II) est inséré en tant que contre-ion dopant dans la matrice polymère (polyMPP) lors de son électrosynthèse via l'oxydation électrochimique de monomères 1-méthyl-3-(pyrrol-1-ylmethyl)pyridinium chlorure (MPP). En imposant à ce film RuBPS/polyMPP en présence d'ions oxalate, un potentiel de 1,250 V vs Ag/AgCl, une réponse lumineuse par électrochimiluminescence est alors détectée.

Cependant ces auteurs notent une faible stabilité dans le temps du film RuBPS/PMPP résultant d'une solubilisation de ce polymère. En outre ils soulignent également la possibilité d'émission d'électrochimiluminescence du RuBPS à l'interface de l'électrode conséquence de son exclusion par diffusion de la matrice PMPP.

Dans cet exemple, la sonde d'électrochimiluminescence est piégée électrostatiquement à la surface de l'électrode. Cette méthode d'immobilisation pose donc un problème en terme de stabilité puisque les complexes de ruthénium peuvent être exclus de la matrice polymère par simple diffusion. De plus, comme le montrent des études réalisées à partir de polypyrrroles solubles fonctionnalisés par des complexes polypyridyle de ruthénium II [5], on peut envisager dans le cas de l'insertion des complexes Ru(bpy)₃²⁺ dans une matrice polymère type polypyrrrole, un effet de quenching de

l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ induit par son confinement dans la matrice polymère. On peut donc penser que l'immobilisation du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ par un lien électrostatique ou covalent dans un polymère est peu favorable à son emploi comme marqueur en vue d'une détection par électrochimiluminescence.

Xu et coll. [6-7] ont adopté une autre démarche où cette fois-ci la molécule cible est marquée par la sonde d'électrochimiluminescence. Cette dernière n'est donc plus insérée à l'électrode via une matrice polymère comme précédemment. Ces auteurs, pour contourner le problème précité de suroxydation du film de polymère conducteur, ont appliqué cette détection par électrochimiluminescence à un biocapteur à ADN constitué de simples brins d'ADN immobilisés sur une électrode recouverte par un film d'alcanebisphosphonate d'aluminium. Le phénomène d'hybridation entre ces fragments d'ADN immobilisés et des brins complémentaires en solution a été mis en évidence via électrochimiluminescence de complexes $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ soit insérés comme intercalant ou greffés préalablement sur les brins complémentaires.

Il existe donc un réel besoin d'une méthode alternative de détection d'une reconnaissance moléculaire par électrochimiluminescence, qui puisse facilement être mise en œuvre, même sur des capteurs et biopuces telles que les systèmes MICAM (marque déposée), et qui ne présente pas les inconvénients des techniques de l'art antérieur, et notamment, qui ne s'accompagne pas d'une destruction irréversible du

marqueur électrochimiluminescent et surtout du film de polymère conducteur.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

5 La présente invention a précisément pour but de fournir une telle méthode alternative et de résoudre les problèmes précités de l'art antérieur en fournissant un procédé de détection d'une reconnaissance moléculaire entre une molécule sonde 10 fixée sur un support et une molécule cible recherchée dans un échantillon à tester, ledit procédé permettant en outre une détection qualitative et quantitative précise et sensible de la molécule cible lorsqu'elle est présente dans un échantillon.

15 Ledit procédé de la présente invention comprend les étapes suivantes :

- a) mettre en présence un support test comprenant une surface comportant un film polymère conducteur électronique sur lequel est fixée une molécule sonde,
- 20 b) marquer avant ou après l'étape c) la molécule cible avec un marqueur électrochimiluminescent,
- c) mettre en contact la molécule cible avec le support test dans des conditions physiques et chimiques permettant la reconnaissance moléculaire et 25 l'assemblage spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible,
- d) rincer le support test de manière à supprimer l'excès de marqueur électrochimiluminescent tout en préservant l'assemblage spécifique entre la molécule 30 sonde et la molécule cible de l'étape c), et

e) soumettre le support test rincé obtenu à l'étape d) à une lecture du signal d'électrochimiluminescence déclenchée par un transfert électronique entre le marqueur de la cible et le 5 support en présence d'un relais rédox.

La détection d'une chimiluminescence à l'étape e) révèle un assemblage par reconnaissance moléculaire au sens précité entre la molécule sonde fixée sur le support et la molécule cible recherchée, et donc la 10 présence de la molécule cible dans l'échantillon testé.

Dans le procédé de la présente invention, la détection de la reconnaissance entre la molécule sonde et la molécule cible marquée est basée sur la chimiluminescence électrogénérée, ou 15 électrochimiluminescence (ECL). Il s'agit d'une détection optique permettant de s'affranchir des inconvénients des procédés de l'art antérieur tout en conservant la sensibilité des détecteurs optiques. En effet, le déclenchement électrique de la 20 chimiluminescence ne concerne que le marqueur chimiluminescent et non pas le support test ou les biomolécules. En outre, ce nouveau mode de détection appliqué aux biopuces permet d'effectuer des mesures quantitatives de la reconnaissance molécules 25 sondes/molécules cibles contrairement à la détection par fluorescence. De plus, l'excitation par une impulsion électrique conforme à la présente invention permet un contrôle spatial et une mise en œuvre rapide et aisée tout en s'affranchissant d'un appareillage 30 coûteux d'excitation laser utilisé dans l'art antérieur.

La présente invention trouve donc notamment une application dans le domaine des biopuces, où le support sur lequel est déposé le film conducteur conformément à la présente invention forme la biopuce.

5 Selon l'invention, le support peut être un quelconque des supports utilisés par l'homme du métier pour la fabrication de biopuces. A titre d'exemples non limitatifs, peuvent être utilisés un support en métal tel que Au, Pt, etc. ; un support constitué d'un
10 matériau semi-conducteur ; un support verre/ITO ; un support en verre ou quartz métallisé ; un support plastique/ITO ; un support en plastique métallisé ; un support en carbone vitreux ; ou un support formé par dépôt d'un matériau conducteur sérigraphié sur un
15 substrat isolant ou sur un des supports précités.

Selon la présente invention, le film polymère conducteur électronique peut être un film de polymère conducteur tel que ceux utilisés par l'homme du métier pour la fabrication de biopuces sur lesquelles sont greffées des sondes. Par exemple le polymère peut être un polymère conducteur tel que ceux décrits dans les
20 « Techniques de l'Ingénieur » -A3140- sous la dénomination « polymères conducteurs intrinsèques » : il s'agit de polymères formés de molécules porteuses de liaisons conjuguées (oligomères ou réseaux réticulés) et éventuellement dopés par des dopants donneurs ou accepteurs d'électrons tels que les poly(acétylène), le
25 poly(nitrure de soufre), le polyphénylène, le polypyrrrole, le poly(sulfure de phénylène), le polythiophène, le polyaniline etc. A titre d'exemple non limitatif, il peut s'agir d'un film de

polypyrrole ; de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) ou de leur dérivés.

Selon la présente invention, le film polymère conducteur peut être déposé sur le support en utilisant 5 les techniques classiques connues de l'homme du métier, par exemple l'électrodéposition ou l'électropolymérisation ou le dépôt par centrifugation ("spin coating") ou encore le jet d'encre.

Selon l'invention, le film polymère conducteur 10 peut être élaboré à partir de simples monomères de type pyrrole ou d'oligomères pré-synthétisés comme des oligothiophènes, ainsi qu'à partir de systèmes moléculaires plus complexes comme des unités complexantes de métaux de transition tels que les 15 phénantrolines, la phénylpyridine, etc., portant des unités électropolymérisables ce qui conduit lors de l'élaboration du polymère à un réseau conjugué.

Selon l'invention, la molécule sonde peut être 20 par exemple de l'ADN simple ou double brin, un oligonucléotide, un anticorps, une protéine, un sucre ou un enzyme, ainsi que toute molécule ou biomolécule permettant une reconnaissance spécifique et un assemblage tels que définis ci-dessus.

Selon l'invention, la fixation de la molécule 25 sonde sur le film polymère conducteur peut se faire par les méthodes classiques de chimie utilisées pour fixer des sondes sur une biopuce. La liaison entre le film et la sonde peut être d'adsorption, électrostatique, chimique obtenue par auto-assemblage, silanisation, ou 30 par toute méthode chimique, électrochimique, photochimique, etc. connue de l'homme du métier pour le

dépôt de la molécule sonde par exemple fonctionnalisée par un groupement apportant la propriété d'auto-assemblage, d'ancrage, de couplage, ou polymérisable chimiquement, électrochimiquement, photochimiquement ou 5 électrophotochimiquement par photosensibilisation.

Selon l'invention, liaison entre le film polymère conducteur électronique déposé sur le support et la sonde peut être obtenue en une étape par exemple par le procédé MICAM (marque déposée).

10 Les documents FR-A-2 787 581, FR-A-2 787 582 et US 5 810 989 décrivent par exemple des techniques de dépôt de film et de fixation de molécules sondes utilisables dans la présente invention. Il s'agit par exemple d'électro-copolymérisation sur un support, par 15 exemple sur un substrat de silice, de monomères précurseurs du polymère conducteur, tel que le pyrrole, avec des monomères, par exemple de pyrrole, fonctionnalisés par une molécule sonde selon la présente invention, par exemple des oligonucléotides.
20 Dans ces techniques, on exploite l'adhésion du film conducteur de polypyrrrole sur le substrat de façon à y réaliser la fixation des molécules sondes de reconnaissance.

Selon l'invention, la sonde peut aussi être fixée 25 sur le film après son dépôt sur le support par exemple par post-fonctionnalisation du film, par exemple de polypyrrrole (Ppy), déposé par exemple par électrogreffage sur le support, par un système de reconnaissance par affinité, par exemple un système 30 avidine/biotine ou des systèmes équivalents, ou des dérivés de ces systèmes. Ceci conduit par exemple aux

structures support (S)-film conducteur-molécule sonde suivantes : S-PPy-ADN ; S-PPy-biotine/avidine/biotine-ADN ; S-PPy-biotine/avidine-protéine ; S-PPy-biotine/avidine/biotine-anticorps, utilisables selon la 5 présente invention. Ces structures sont par exemple utilisables sur un support (S) d'or (Au) ou de silice, ou sur tout support précité permettant le greffage du polymère conducteur.

Cette fixation peut se faire par exemple avec 10 adressage des sondes. Il s'agit par exemple d'un adressage photochimique, d'un adressage mécanique, par exemple par micropipetage à l'aide d'un robot disperseur, ou d'un adressage électrochimique. Ces techniques de fixation de sondes sur un film polymère 15 sont connues de l'homme du métier. L'adressage présente l'avantage qu'il permet ensuite des analyses multiparamétriques.

L'ancre de la molécule sonde peut se faire par simple couplage entre deux fonctions chimiques 20 réactives, par exemple type ester activé et une amine, l'une de ces fonctions étant portée par la molécule sonde et l'autre ancrée sur le film. Le couplage chimique sonde/film peut être empêché en bloquant la réactivité de la fonction chimique portée par le film. 25 L'empêchement peut être levé, « débloqué », en rendant à nouveau la fonction réactive, ceci grâce par exemple à une activation électrochimique ou photochimique. A l'issue, le couplage de la molécule sonde sur le film est à nouveau possible.

30 Selon l'invention, le marquage de la cible par le marqueur électrochimiluminescent peut être antérieur ou

postérieur à l'étape c) de mise en contact de la molécule cible avec le support test. En d'autres termes, le marquage de la molécule cible peut être effectué soit sur l'échantillon à tester avant sa mise 5 en contact avec le support test, c'est à dire avant que l'assemblage molécule sonde/molécule cible se fasse, soit sur le support test après l'étape c) de mise en contact de la molécule cible avec le support test, c'est à dire, lorsque l'assemblage molécule 10 sonde/molécule cible s'est fait. L'homme du métier saura adapter le procédé de la présente invention par exemple suivant le type de molécules sonde/cible mises en jeu.

Selon l'invention, le marqueur peut être un des 15 marqueurs électrochimiluminescents connus de l'homme du métier. Il peut s'agir au sens large d'un marqueur ayant des propriétés d'électrochimiluminescence dont le potentiel de déclenchement de l'ECL en présence du co-substrat, se situe dans un domaine de potentiel où le 20 film polymère conducteur présente un effet de suroxydation. Cette suroxydation se manifeste par une dégradation notable des propriétés de conductivités électroniques du film polymère conducteur.

Avantageusement, le marqueur 25 électrochimiluminescent peut être un complexe organométallique. Il peut être choisi par exemple dans le groupe comprenant les complexes d'osmium et de ruthénium avec des ligands identiques ou différents de bi ou terpyridine et/ou de phénantroline et leurs 30 dérivés ; un cryptate d'europium ou des esters d'acridinium.

Dans ce cas, le marquage de la cible peut se faire par liaison entre la cible et le complexe métallique. Elle peut être directe par couplage chimique, comme par exemple entre le complexe 5 métallique portant une fonction ester activé et la molécule cible possédant une fonction terminale amine NH₂, ou par le biais d'un couplage par affinité de type biotine/avidine, par exemple ADN_{cible}-biotine/avidine-métal. Des protocoles de marquage de la cible 10 utilisables dans la présente invention sont décrits par exemple dans les documents [1] et [2].

Dans le procédé de la présente invention, le relais redox a pour but, dans l'étape e), de pouvoir déclencher l'électrochimiluminescence du marqueur à un potentiel inférieur à celui appliqué en l'absence de relais redox par transfert des électrons du marqueur vers le film polymère déposé sur le support. Il agit comme un relais redox entre le marqueur et le film, et abaisse le potentiel de lecture de 15 l'électrochimiluminescence. Ainsi, le potentiel de lecture de l'électrochimiluminescence étant inférieur à celui qui devrait être utilisé pour le marquer seul, le film polymère conducteur est préservé de la suroxydation et donc de la dégradation notable de ses propriétés de 20 conductivités électroniques.

Ce relais redox peut être en solution, ou immobilisé, par exemple par greffage, sur le support avec le film ou avec l'assemblage résultant de la reconnaissance moléculaire entre la sonde et la cible, 25 par exemple sous la forme d'intercalant possédant des propriétés redox ou comportant des groupements redox.

L'homme du métier saura adapter le procédé de la présente invention en fonction des molécules cibles et sondes en jeu. A titre d'exemples non limitatifs, il peut être choisi parmi : un groupement métallocène, par 5 exemple un ferrocène ou un diferrorocène ; des complexes de métaux de transition tel qu'un complexe de cobalt, ou d'autres métaux de transition ; un groupement de la famille de la phénothiazine, du méthylviologène et de leurs dérivés respectifs ; ou des intercalants de l'ADN 10 possédant des propriétés rédox ou comportant des groupements rédox ; des amines aromatiques ou hétérocycles, etc.

Dans certains cas, par exemple pour les complexes du ruthénium, la lecture du signal 15 d'électrochimiluminescence déclenchée par un transfert électronique indirect entre le marqueur de la cible et le support via un relais rédox peut devoir être réalisée en présence d'un substrat sacrificiel. Ce composé peut-être par exemple un de ceux décrits dans 20 le document [1], par exemple une amine aliphatique telle que la tripropylamine (Pr_3N) qui génère un agent réducteur $\text{Pr}_2\text{N}-\text{CH}^\circ-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, selon la réaction (6) ci-dessus, qui peut soit réagir avec le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ pour former l'état excité $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$, selon la réaction 25 (7) ci-dessus, ou réduire l'espèce $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, selon la réaction (8) ci-dessus, pour conduire au $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ selon la réaction (3) ci-dessus.

Ainsi, le complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ n'est pas épuisé mais régénéré lors de l'électrochimiluminescence par 30 contre le substrat sacrificiel est irréversiblement consommé.

La figure 1 est une représentation schématique d'un transfert électronique entre la molécule cible marquée et le support via le relais rédox et le film conducteur électronique lors d'une lecture 5 d'électrochimiluminescence conformément au procédé de la présente invention. Sur cette figure, « su » représente le support, « f » le film conducteur électronique, « li » la liaison film conducteur électronique/molécule sonde, « S » la molécule sonde, « C » la molécule cible, « m » le marqueur, « t » la liaison entre la molécule cible et le marqueur, « e⁻ » le transfert d'électrons, « Mox/Mréd » le relais (M) rédox (ox = oxydant ; réd = réducteur) permettant le transfert électronique, et « hv » 10 l'electroluminescence. La présence d'une éventuelle molécule sacrificielle n'est pas représentée.

L'étape finale de lecture d'électrochimiluminescence peut être réalisée au moyen d'un luminomètre qui mesure l'intensité de luminescence 20 émise, par exemple à 610 nm pour les complexes du ruthénium. L'intensité de luminescence émise est proportionnelle à la concentration de molécules cibles assemblées aux molécules sondes.

Dans le procédé de la présente invention, la détection directe, c'est à dire sans relais rédox, est impossible ou très difficile. En effet, comme illustré dans la partie art antérieur ci-dessus, le potentiel de déclenchement de l'ECL sans relais rédox est incompatible avec les propriétés de conduction 25 électronique du film de polymère tel que le pyrrole car situé dans un domaine de potentiel où le pyrrole est 30

dans un état de suroxydation avancée et donc joue le rôle d'une couche quasi-passivante rendant le transfert électronique direct support/sonde insuffisant pour permettre la détection de l'ECL.

5 Le potentiel de lecture de l'ECL dans le procédé de la présente invention est abaissé, ce qui préserve le film de polymère de sa suroxydation, et permet la lecture de l'ECL.

10 Dans le procédé de la présente invention, le transfert électronique du support vers le marqueur electrochimiluminescent en présence du relais rédox peut donc s'effectuer au travers d'un film polymère conducteur électronique ce qui n'est pas le cas dans les systèmes développés par Xu et coll. [6-7]. En effet
15 pour ces systèmes de l'art antérieur, l'ancrage du groupement electrochimiluminescent sur le support est réalisé par l'intermédiaire respectivement d'alcane bisphosphonate d'aluminium et d'aminohexane, couches qui sont non-conductrices.

20 Dans la présente invention, l'immobilisation du marqueur electrochimiluminescent est réalisée spécifiquement sur l'analyte cible contrairement aux procédés où le complexe est immobilisé dans une matrice polymère sur l'électrode [3,4].

25 L'emploi d'un relais rédox selon la présente invention favorise et rend possible le transfert électronique support/film conducteur électronique/marqueur et donc les performances de ce mode de détection par electrochimiluminescence.

30 De plus, dans le procédé de la présente invention, le support peut présenter une double

fonction active permettant (i) l'immobilisation électro-contrôlée de l'objet biologique au sein du film conducteur électronique et (ii) l'activation en tant que "déclencheur" du processus 5 d'électrochimiluminescence du marqueur électrochimiluminescent en présence du relais ce qui permet son application à un système multiparamétrique (analyse en parallèle, ou "multi-array") de type 10 biopuce basée sur la technologie développée depuis plusieurs années utilisant un réseau d'électrodes de type MICAM (marque déposée).

Chaque plot composant une biopuce de type MICAM reconnaissant de manière spécifique une molécule particulière, par exemple une séquence d'ADN, les 15 différentes molécules, par exemple différentes séquences d'ADN, présentes dans un échantillon donné peuvent être détectées simultanément lors de l'analyse. Pour l'application de la présente invention, il suffit d'appliquer, soit de manière séquentielle, soit en 20 parallèle, à chacun des plots d'une telle biopuce, le potentiel de déclenchement de l'électrochimiluminescence du marqueur en présence du relais rédox. Ainsi, par exemple pour de l'ADN, à partir des plots qui présentent une luminescence, il 25 est possible d'identifier les séquences d'ADN présentes dans l'analyte. Le support présente une double fonction active permettant (i) l'immobilisation électro-contrôlée de l'objet biologique sonde, dans cet exemple l'ADN, et (ii) l'activation en tant que déclencheur de 30 l'électrochimiluminescence.

La présente invention permet donc pour la

première fois la mise en œuvre d'un procédé d'électrochimiluminescence sur un système analyse en parallèle ("multi-array") dans lequel le support d'immobilisation est aussi celui qui permet le 5 déclenchement de la chimiluminescence.

L'application de la présente invention à un système multiparamétrique permet en outre une lecture multiparamétrique et/ou en parallèle que n'offre pas les dispositifs de positionnement successifs de l'art 10 antérieur.

De plus, le procédé de la présente invention permet d'effectuer des analyses quantitatives directes tout en éliminant les problèmes de bruit de fond inhérents aux mesures par fluorescence.

15 Enfin, dans la présente invention, l'immobilisation du marqueur est réalisée spécifiquement sur la molécule cible contrairement aux procédés de l'art antérieur faisant intervenir des intercalants électrochimiluminescents dans le cas de 20 biocapteurs à ADN.

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore à l'homme du métier dans les exemples suivants donnés à titre illustratif et non 25 limitatif en référence à la figure annexée.

Brève description de la figure

La figure 1 est une représentation schématique du 30 mécanisme réactionnel de la présente invention.

Exemples

5 **Exemple 1 : ÉLECTROCHIMILUMINESCENCE du complexe Ru(bpy)₃²⁺ en solution sur une électrode de platine recouverte ou non d'un film de polypyrrole.**

Les inventeurs entrepris l'étude de l'électrochimiluminescence à partir du complexe trisbipyridine de ruthénium (Ru(bpy)₃²⁺) en solution. Cette expérience a été réalisée à partir d'une solution 10 1 mM en Ru(bpy)₃²⁺ + 50 mM de tripropylamine (TPA) + LiClO₄ 0,1 M en milieu mixte CH₃CH/H₂O (50 : 50 en volume) ou CH₃CN pur sur une électrode de platine recouverte ou non d'un film de polypyrrole.

15 Sur l'électrode nue, comme attendu, l'émission lumineuse orange débute à partir d'une tension seuil de 0,8 V dont l'intensité croît jusqu'à 1,0 V pour se stabiliser dans la zone de potentiel exploré jusqu'à 1,2 V.

20 Dans les mêmes conditions, mais en utilisant une électrode de platine recouverte d'un film homogène de polypyrrole d'épaisseur 0,08 µm (20 mC/cm²), aucune émission lumineuse est détectée jusqu'à un potentiel de 1,2 V.

25 **Exemple 2 : ÉLECTROCHIMILUMINESCENCE du Pu(bpy)₃²⁺ en solution en présence de N-méthylphénothiazine ou de N-butylphénothiazine sulfonate de sodium sur une électrode de platine recouvert par un film de polypyrrole.**

30 Comme pour l'exemple 1, l'électrochimiluminescence est étudiée à partir du

complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en solution et d'une électrode de platine recouverte par un film de polypyrrole (20 mC/cm^2). Si à la solution précédente (1 mM en $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} + 50 \text{ mM}$ de tripropylamine (TPA) + LiClO_4 5 $0,1 \text{ M}$ dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$), on ajoute 2 mM de N-méthylphénothiazine, il est alors possible d'observer une émission luminescence orange centrée à 610 nm typique d'électrochimiluminescence du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ sur cette électrode recouverte du film de polypyrrole en 10 appliquant seulement qu'un potentiel de $0,65 \text{ V}$. Cette émission est constante tant que cette valeur de potentiel est imposée. Par contre si le potentiel est porté à 1 V , c'est à dire au potentiel où se produit la suroxydation du polypyrrole, cette émission disparaît 15 presque instantanément et irréversiblement.

Ainsi la présence d'un relais rédox conformément à la présente invention, par exemple la N-méthylphénothiazine dans cet exemple, permet d'abaisser le potentiel de déclenchement de l'électrochimiluminescence du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ dans 20 un domaine de potentiel où la matrice formant le film polymère de polypyrrole n'est pas suroxydée, c'est à dire dans un domaine où elle conserve ses propriétés de conductivité électronique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Fahnrich K. A., Pravda M. and Guibault G. G., "Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis" *Talanta* 2001, 54 (4), 531-559.
- [2] Lee W.-Y., *Mikrochim. Acta* 127 (1997) 19.
- [3] Forster R. J. and Hogan C. F., *Anal. Chem.* 72 (2000) 5576.
- [4] Blanchard R. M., Martin A. F., Nieman T. A., Guerrero D. J. and Ferraris J. P., *Mikrochim. Acta* 130 (1998) 55.
- [5] Laguitton-pasquier H., Martre A. and Deronzier A., *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), 4801
- [6] Xu X-H. and Bard A. J., *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 2627.
- [7] Schlenoff J. B., Xu H., *J. Electrochem. Soc.* 139 (1992) 2397.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'une reconnaissance moléculaire entre une molécule sonde fixée sur un support et une molécule cible recherchée dans un échantillon à tester, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :
 - a) mettre en présence un support test comprenant une surface comportant un film polymère conducteur sur lequel est fixée une molécule sonde,
 - b) marquer avant ou après l'étape c) la molécule cible avec un marqueur électrochimiluminescent,
 - c) mettre en contact la molécule cible avec le support test dans des conditions physiques et chimiques permettant la reconnaissance moléculaire et l'assemblage spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible,
 - d) rincer le support test de manière à supprimer l'excès de marqueur électrochimiluminescent tout en préservant l'assemblage spécifique entre la molécule sonde et la molécule cible de l'étape c), et
 - e) soumettre le support test rincé obtenu à l'étape d) à une lecture du signal d'électrochimiluminescence déclenchée par transfert électronique indirect entre le marqueur de la cible et le support via un relais rédox.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le film polymère conducteur est un film de polypyrrole, de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) ou de leur dérivés.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la molécule sonde est choisie parmi de l'ADN simple ou double brin, un anticorps, une protéine ou un enzyme.

5 4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le marqueur électrochimiluminescent est un complexe organométallique dont le potentiel de déclenchement de l'électrochimiluminescence se situe dans un domaine de potentiel où le film polymère conducteur électronique 10 présente un effet de suroxydation.

15 5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le marqueur électrochimiluminescent est choisi dans le groupe comprenant les complexes d'osmium et de ruthénium avec des ligands identiques ou différents de bi ou terpyridine et/ou de phénantroline et leurs dérivés ; un cryptate d'europium ou des esters d'acridinium.

20 6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, dans lequel la lecture du signal d'électrochimiluminescence déclenchée par transfert électronique entre le marqueur de la cible et le support via un relais rédox est réalisée en présence d'un substrat sacrificiel.

25 7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, le relais rédox est choisi parmi un groupement métallocène tel que le ferrocène ou le diferrrocène ; des complexes de métaux de transition tels qu'un 30 complexe de cobalt ; un groupement de la famille de la phénothiazine, du méthylviologène et de leurs dérivés

respectifs ; ou des intercalants de l'ADN possédant des propriétés rédox ou comportant des groupements rédox ; ainsi que des amines aromatiques ou hétérocycles.

5 8. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le relais rédox est en solution ; greffé au film conducteur à conduction électronique ou à la molécule sonde ; ou sous la forme d'intercalant de la molécule sonde possédant des propriétés rédox ou comportant des
10 groupements rédox.

9. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le film polymère conducteur est un film de polypyrrole, le marqueur électrochimiluminescent est un complexe de
15 ruthénium, le relais rédox est une N-méthylphénothiazine, et dans lequel la lecture du signal d'électrochimiluminescence rendue possible par transfert électronique entre le marqueur de la cible et le support via le relais rédox est réalisée en présence
20 d'une amine aliphatique telle que la tripropylamine.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le support est un support multiparamétrique.
25

11. Utilisation d'un procédé selon la revendication 1, pour réaliser une analyse quantitative ou qualitative d'une molécule cible présente dans un échantillon.

12. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans un système d'analyse multiparamétrique et/ou en parallèle.

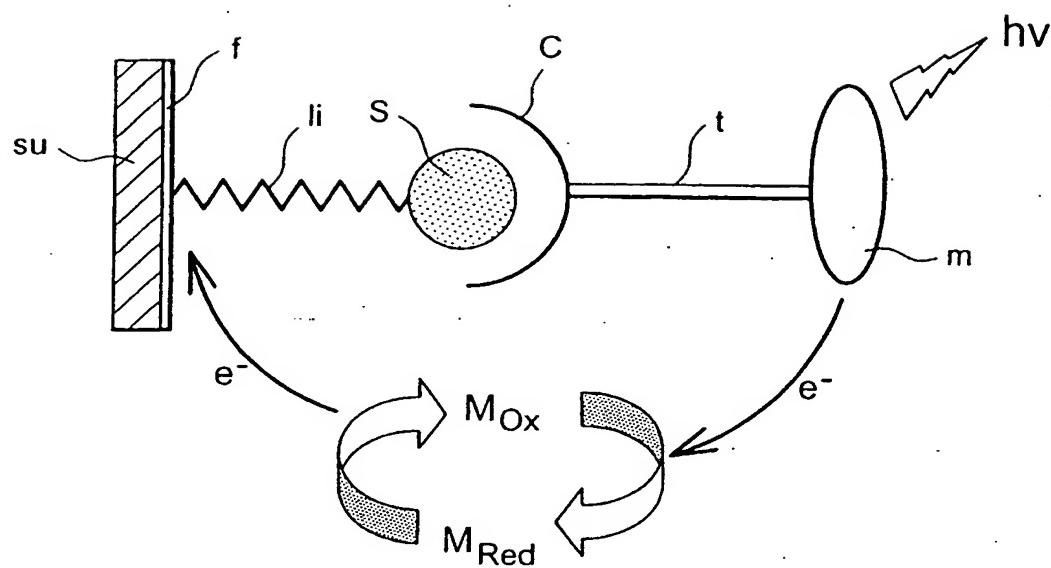


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/02058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 G01N21/76 G01N21/66 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 140 045 A (WOHLSTADTER JACOB ET AL) 31 October 2000 (2000-10-31) column 11, line 5 - line 17 column 13, line 53 - line 60 column 20, line 50 -column 21, line 20 column 33, line 25 - line 29 column 38, line 4 - line 41; figures 12,13 ---	1-12
A	US 6 319 670 B1 (GUDIBANDE SATYANARAYANA ET AL) 20 November 2001 (2001-11-20) column 5, line 4 - line 7 column 7, line 6 - line 25 ---	2,6,7,9
A	WO 98 36266 A (ALA KLEME TIMO VAEINOE KALEVI ;KORPELA TIMO KALEVI (FI); KULMALA S) 20 August 1998 (1998-08-20) ---	-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 2003

Date of mailing of the international search report

26/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tabellion, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No
PCT/FR 03/02058**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 32662 A (IGEN INT INC) 1 July 1999 (1999-07-01) -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02058

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 6140045	A	31-10-2000	AU	720625 B2		08-06-2000
			AU	5420596 A		02-10-1996
			BR	9607193 A		11-11-1997
			CA	2213854 A1		19-09-1996
			CN	1186513 A		01-07-1998
			CZ	9702844 A3		14-10-1998
			EA	1198 B1		25-12-2000
			EP	0821726 A1		04-02-1998
			HU	9801679 A2		28-10-1998
			JP	11502617 T		02-03-1999
			NZ	306051 A		29-11-1999
			WO	9628538 A1		19-09-1996
			US	6066448 A		23-05-2000
			US	6207369 B1		27-03-2001
			US	2001021534 A1		13-09-2001
			US	6090545 A		18-07-2000
			ZA	9601925 A		05-08-1997
US 6319670	B1	20-11-2001	US	6096500 A		01-08-2000
			US	5679519 A		21-10-1997
			AU	2002799 A		12-07-1999
			EP	1042508 A1		11-10-2000
			WO	9932662 A1		01-07-1999
			US	2003003460 A1		02-01-2003
			AU	5743896 A		29-11-1996
			WO	9635812 A1		14-11-1996
WO 9836266	A	20-08-1998	FI	970593 A		13-08-1998
			AU	5989698 A		08-09-1998
			EP	0960330 A1		01-12-1999
			WO	9836266 A1		20-08-1998
			US	6251690 B1		26-06-2001
			US	2002081749 A1		27-06-2002
WO 9932662	A	01-07-1999	US	6319670 B1		20-11-2001
			AU	2002799 A		12-07-1999
			EP	1042508 A1		11-10-2000
			WO	9932662 A1		01-07-1999
			US	2003003460 A1		02-01-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/02058

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 GO1N21/76 GO1N21/66 GO1N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 GO1N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 140 045 A (WOHLSTADTER JACOB ET AL) 31 octobre 2000 (2000-10-31) colonne 11, ligne 5 - ligne 17 colonne 13, ligne 53 - ligne 60 colonne 20, ligne 50 - colonne 21, ligne 20 colonne 33, ligne 25 - ligne 29 colonne 38, ligne 4 - ligne 41; figures 12,13 ---	1-12
A	US 6 319 670 B1 (GUDIBANDE SATYANARAYANA ET AL) 20 novembre 2001 (2001-11-20) colonne 5, ligne 4 - ligne 7 colonne 7, ligne 6 - ligne 25 ---	2,6,7,9
A	WO 98 36266 A (ALA KLEME TIMO VAEINOE KALEVI ;KORPELA TIMO KALEVI (FI); KULMALA S) 20 août 1998 (1998-08-20) --- -/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutifs la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/11/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Tabellion, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02058

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99 32662 A (IGEN INT INC) 1 juillet 1999 (1999-07-01) -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/02058

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6140045	A	31-10-2000	AU	720625 B2	08-06-2000
			AU	5420596 A	02-10-1996
			BR	9607193 A	11-11-1997
			CA	2213854 A1	19-09-1996
			CN	1186513 A	01-07-1998
			CZ	9702844 A3	14-10-1998
			EA	1198 B1	25-12-2000
			EP	0821726 A1	04-02-1998
			HU	9801679 A2	28-10-1998
			JP	11502617 T	02-03-1999
			NZ	306051 A	29-11-1999
			WO	9628538 A1	19-09-1996
			US	6066448 A	23-05-2000
			US	6207369 B1	27-03-2001
			US	2001021534 A1	13-09-2001
			US	6090545 A	18-07-2000
			ZA	9601925 A	05-08-1997
US 6319670	B1	20-11-2001	US	6096500 A	01-08-2000
			US	5679519 A	21-10-1997
			AU	2002799 A	12-07-1999
			EP	1042508 A1	11-10-2000
			WO	9932662 A1	01-07-1999
			US	2003003460 A1	02-01-2003
			AU	5743896 A	29-11-1996
			WO	9635812 A1	14-11-1996
WO 9836266	A	20-08-1998	FI	970593 A	13-08-1998
			AU	5989698 A	08-09-1998
			EP	0960330 A1	01-12-1999
			WO	9836266 A1	20-08-1998
			US	6251690 B1	26-06-2001
			US	2002081749 A1	27-06-2002
WO 9932662	A	01-07-1999	US	6319670 B1	20-11-2001
			AU	2002799 A	12-07-1999
			EP	1042508 A1	11-10-2000
			WO	9932662 A1	01-07-1999
			US	2003003460 A1	02-01-2003